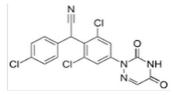
# Determinazione dei coccidiostatici autorizzati nei mangimi: esito del PT 2014 organizzato dal EURL-FA

#### C. Civitareale & M. Fiori

LNRs Metalli Pesanti negli Alimenti e nei Mangimi e Additivi nei Mangimi

V Workshop

19-20 Novembre 2015, Roma











La Direzione Generale per la Sanità e la Sicurezza Alimentare della Commmissione (DG SANTE)

Additivi nei Mangimi (*Institute for Reference Materials* and *Measurements - Joint Research Centre*) di organizzare un PT rivolto ai LNRs per

valutare la capacità di determinare correttamente gli 11 coccidiostatici autorizzati nei mangimi (come FA e come sostanze indesiderate)



# Nel 2014 l'EURL-FA ha organizzato il PT



"Determination of authorised coccidiostats at additive and cross-contamination level in feedingstuffs"

Invio dei campioni ai LNRs - 18 giugno Invio dei risultati all'EURL - 29 agosto



Matrice: mangime completo per polli e per suini

### 2 mangimi per polli:

- √ + monensin, narasin, diclazuril e robenidina (MAT 1)
- ✓ + lasalocid, decochinato, semduramicina e alofuginone (MAT 2)

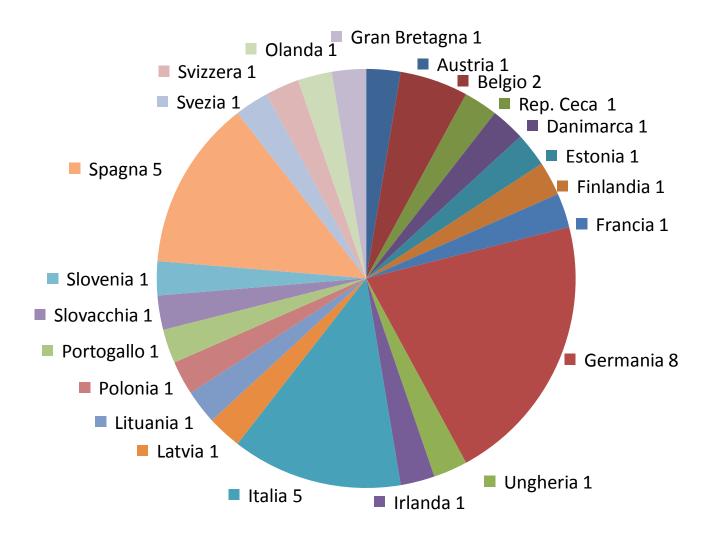
#### 2 mangimi per suini:

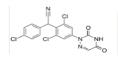
- ✓ Negativo (MAT 3)
- √ + diclazuril a livello di 1 mg/kg (livello FA) (MAT 4)

I laboratori non conoscono la composizione dei campioni - screening per la presenza di tutti gli 11 cocciostatici e quantificazione di quelli rilevati.



### Hanno partecipato 38 laboratori provenienti da 22 nazioni













# Italia – laboratori partecipanti

- 1. Istituto Superiore di Sanità (LNR additivi nei mangimi)
- 2. IZS Lazio e Toscana
- 3. IZS Lombardia ed Emilia Romagna
- 4. IZS Piemonte Liguria e Valle d'Aosta
- 5. IZS Umbria e Marche



### Non tutti i laboratori hanno riportato i risultati per tutti gli 8 analiti aggiunti

38: monensin e narasin

37: lasalocid

35: robenidina

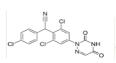
32: diclazuril

31: decochinato

29: semduramicina

26: alofuginone

32: diclazuril (FA)













# Italia - molecole analizzate dai laboratori partecipanti

Istituto Superiore di Sanità (LNR additivi nei mangimi) + 3 labs: 8 analiti + diclazuril FA

1 lab: ionofori e robenidina - no decochinato, alofuginone, semduramicina e diclazuril (FA)



I risultati dei laboratori sono stati valutati usando z- e ζ-scores (zeta-scores)

I valori degli scores sono considerati

|score | ≤ 2 soddisfacenti

2 < |score | ≤ 3 da valutare

|score| > 3 non soddisfacenti



$$z = \frac{x_{lab} - x_a}{\sigma_p}$$

$$\zeta = \frac{x_{lab} - x_a}{\sqrt{u_{lab}^2 + u_a^2}}$$

x <sub>lab</sub> = risultato ottenuto dai labs Dove:

x<sub>a</sub> = valore assegnato

u<sub>lab</sub> = incertezza tipo riportata dai labs

= incertezza tipo del valore assegnato

 $\sigma_{\rm p}$  = scarto tipo della prova valutativa (equazione Horwitz o modificata Thompson (diclazuril e alofuginone)

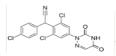








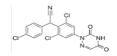


Table 2: Assigned concentrations  $(X_a)$  in mg kg $^{-1}$  of feed, expressed as mean value  $\pm$  expanded uncertainty (k=2) and target standard deviations in %. The mean concentrations  $(C_{homogeneity})$  obtained

during the homogeneity study are given for information.

| Test<br>item | Measurand    | $x_a \pm U_a (k=2)$ $mg kg^{-1}$ |       |       | Target standard deviation $\sigma_p(\%)$ | C <sub>homogeneity</sub> (mg kg <sup>-1</sup> ) | ± | U <sub>homogeneity</sub> (k=2) |  |
|--------------|--------------|----------------------------------|-------|-------|--|---|---|--------------------------------|--|
|              |              | A                                | ssign | ed    |  | Observed (n=20)                                 |   |                                |  |
|              | Monensin     | 1.083                            | ±     | 0.070 | 15.7                                     | 1.035   | ± | 0.060                          |  |
| MAT 1        | Narasin      | 0.692                            | ±     | 0.045 | 16.8                                     | 0.689   | ± | 0.030                          |  |
|              | Diclazuril   | 0.010                            | ±     | 0.001 | 22.0                                     | 0.010   | ± | 0.001                          |  |
|              | Robenidine   | 0.609                            | ±     | 0.025 | 17.1                                     | 0.673   | ± | 0.004                          |  |
|              | Lasalocid    | 1.195                            | ±     | 0.080 | 15.5                                     | 1.236   | ± | 0.068                          |  |
| MAT 2        | Decoquinate  | 0.394                            | ±     | 0.018 | 18.3                                     | 0.409   | ± | 0.014                          |  |
|              | Semduramicin | 0.223                            | ±     | 0.026 | 19.9                                     | 0.259   | ± | 0.022                          |  |
|              | Halofuginone | 0.025                            | ±     | 0.002 | 22.0                                     | 0.024   | ± | 0.002                          |  |
| MAT 4        | Diclazuril   | 1.494                            | ±     | 0.058 | 15.0                                     | 1.430   | ± | 0.054                          |  |
|              |              | Foi                              | rmula | tion  |  | Homogeneity                                     |   |                                |  |

Tratto da EURL-FA Report finale 2015











### z-scores



Table 1: Summary results of the proficiency test exercise expressed as z-scores. x<sub>a</sub> is the assigned value for the analytes.

| Analyte         | Xa                  | Number of       | Total number of | Relative number |
|-----------------|---------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                 | mg kg <sup>-1</sup> | satisfactory z- | z-scores        | of satisfactory |
|                 |                     | scores          |                 | results         |
|                 |                     |                 |                 | (%)             |
| Monensin        | 1.083               | 30              | 38              | 79              |
| Narasin         | 0.692               | 30              | 38              | 79              |
| Lasalocid       | 1.195               | 27              | 37              | 73              |
| Diclazuril      | 0.010               | 23              | 32              | 72              |
| Decoquinate     | 0.394               | 21              | 31              | 68              |
| Halofuginone    | 0.025               | 17              | 26              | 65              |
| Robenidine      | 0.609               | 22              | 35              | 63              |
| Semduramicin    | 0.223               | 20              | 29              | 69              |
| Diclazuril (FA) | 1.494               | 22              | 30              | 69              |

Tratto da EURL-FA Report finale 2015

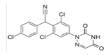






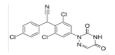




Table 4a: Laboratories having reported satisfactory results

| Labs with | Labs      | Labs with  |
|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|
| Z ≤ 2 for | with  Z ≤ | Z  ≤ 2 for |
| 9         | 2 for 8   | 2 for 7   | 2 for 6   | 2 for 4   | 2 for 4   | 2 for 3   | 2 for 2   | 2 for 1   | 0          |
| analytes  | analyte   | analyte    |
| L09       | L07       | L01       | L02       | L06       | L13*      | L16*      | L08*      | L11*      | L38*       |
| L29       | L12       | L03       | L04*      | L18       | L31       | L20*      | L32       |           | L17*       |
| L35       | (L21)     | L05*      | L15*      | L23*      |           |           |           |           |            |
|           | L27       | L10       | L22       | L24*      |           |           |           |           |            |
|           | L30       | L14       | L37*      | L25       |           |           |           |           |            |
|           |           | L19       |           | L26*      |           |           |           |           |            |
|           |           | L34*      |           | L28       |           |           |           |           |            |
|           |           | L36       |           | L33       |           |           |           |           |            |

22 laboratories (58%) performed the analysis for all 9 targeted coccidiostats; laboratories marked with an \* performed the analysis for 2 to 8 coccidiostats out of the 9 targeted (details in Table 4b).











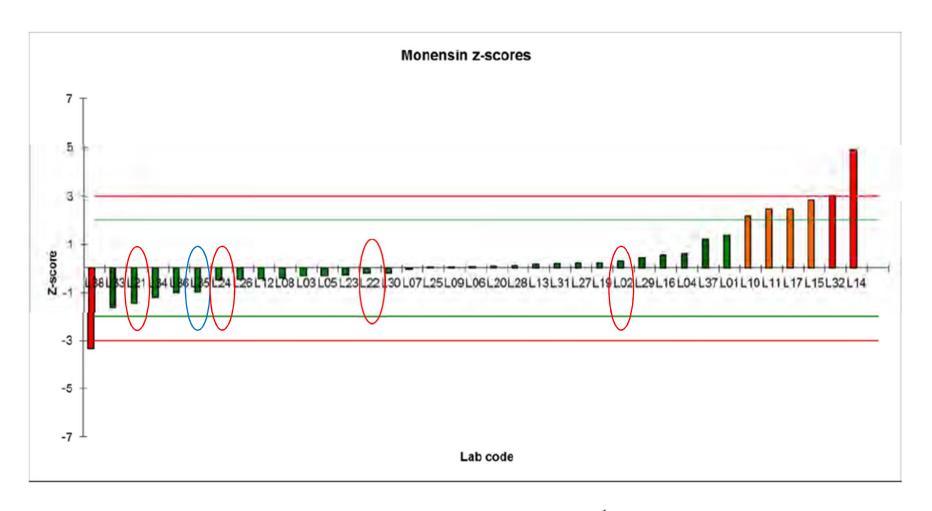


Figure 3: Z-scores for the determination of monensin ( $x_a$ : 1.083 mg kg<sup>-1</sup>) for the participating laboratories. The green line shows the limit for satisfactory and the red line for questionable performance.



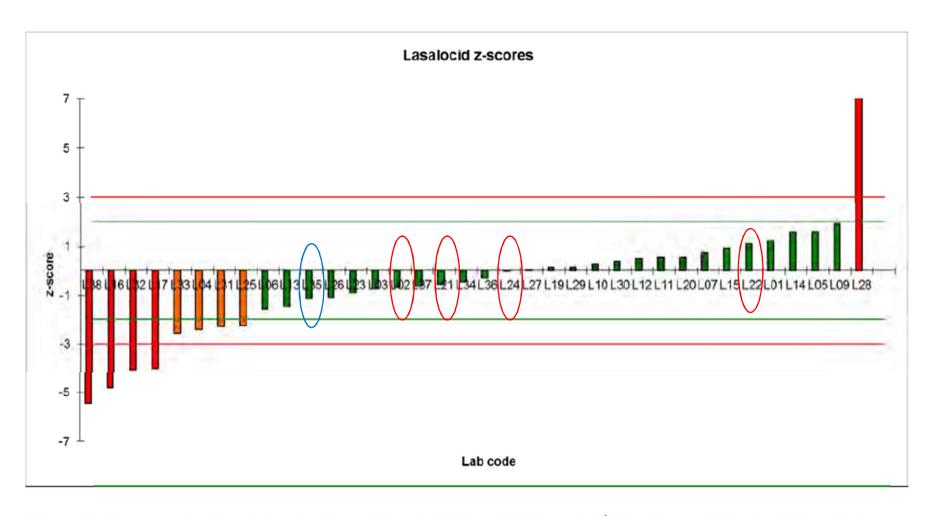


Figure 5: Z-scores for the determination of lasalocid (x<sub>a</sub>: 1.195 mg kg<sup>-1</sup>) for the participating laboratories. The green line shows the limit for satisfactory and the red line for questionable performance.



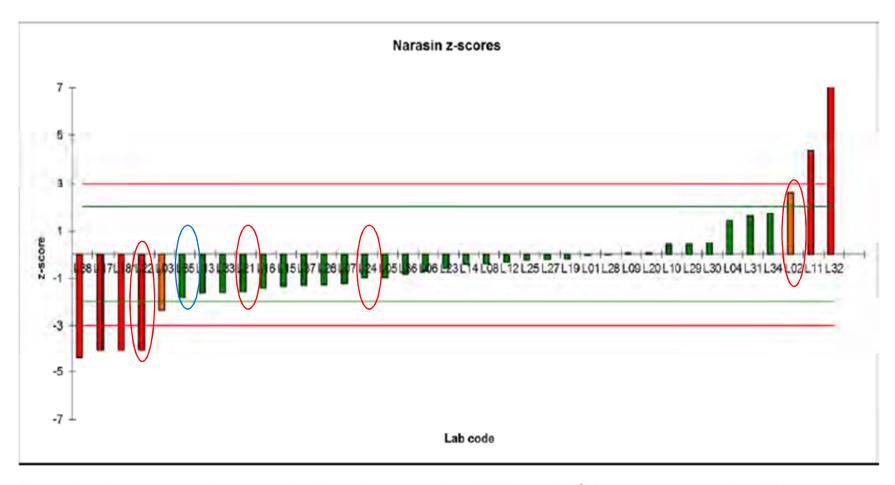


Figure 7: Z-scores for the determination of narasin (x<sub>a</sub>: 0.692 mg kg<sup>-1</sup>) for the participating laboratories. The green line shows the limit for satisfactory and the red line for questionable performance.



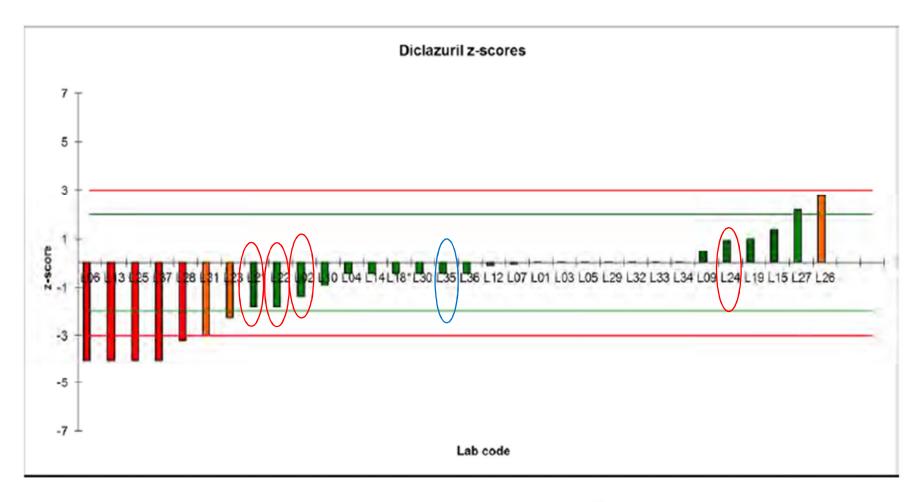


Figure 9: Z-scores for the determination of diclazuril (x<sub>a</sub>: 0.010 mg kg<sup>-1</sup>) for the participating laboratories. The green line shows the limit for satisfactory and the red line for questionable performance.



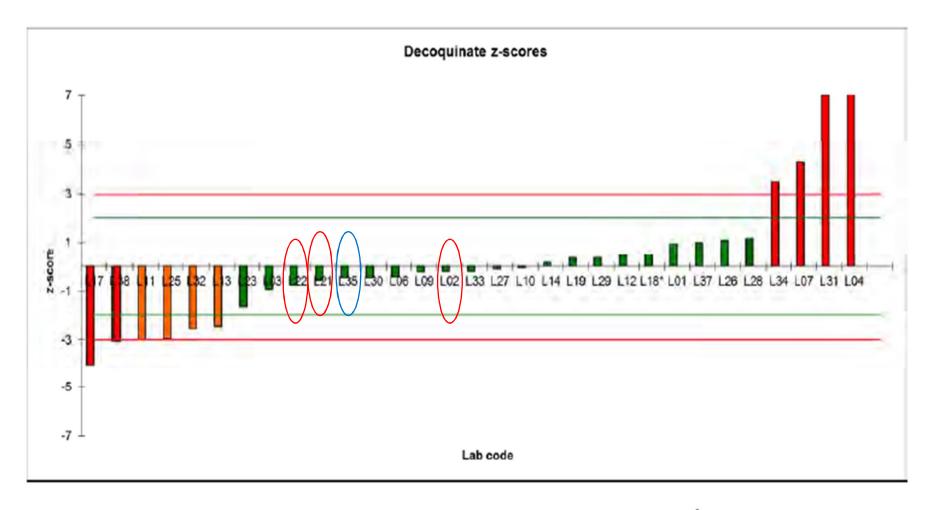


Figure 11: Z-scores for the determination of decoquinate (x<sub>a</sub>: 0.394 mg kg<sup>-1</sup>) for the participating laboratories. The green line shows the limit for satisfactory and the red line for questionable performance.



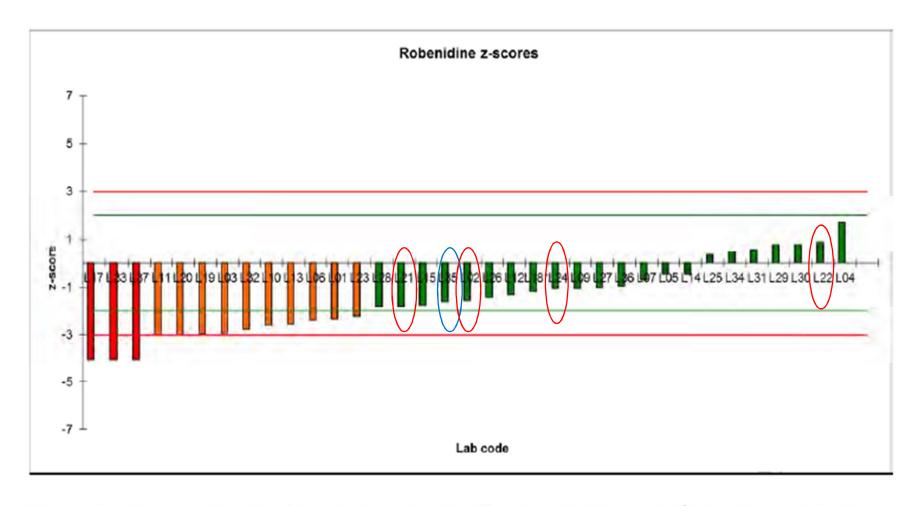


Figure 13: Z-scores for the determination of robenidine (x<sub>a</sub>: 0.609 mg kg<sup>-1</sup>) for the participating laboratories. The green line shows the limit for satisfactory and the red line for questionable performance.



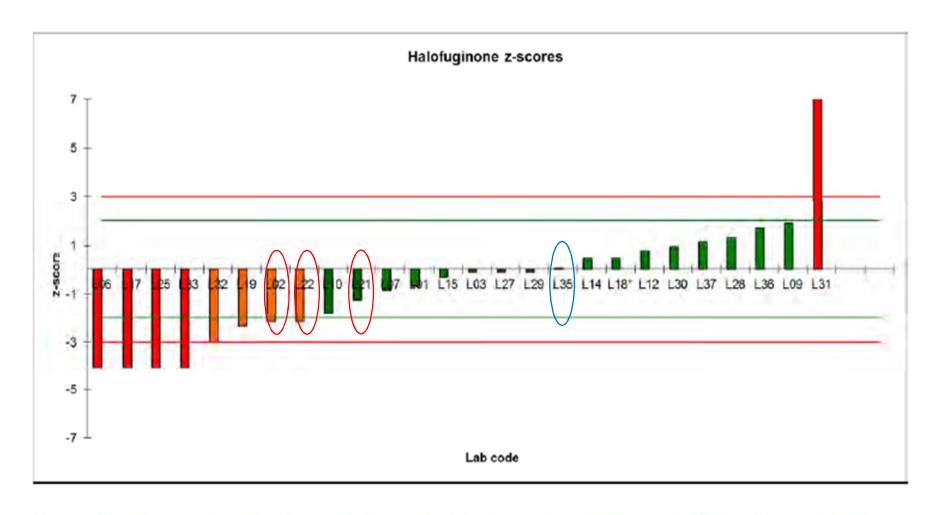


Figure 15: Z-scores for the determination of halofuginone ( $x_a$ : 0.025 mg kg<sup>-1</sup>) for the participating laboratories. The green line shows the limit for satisfactory and the red line for questionable performance.



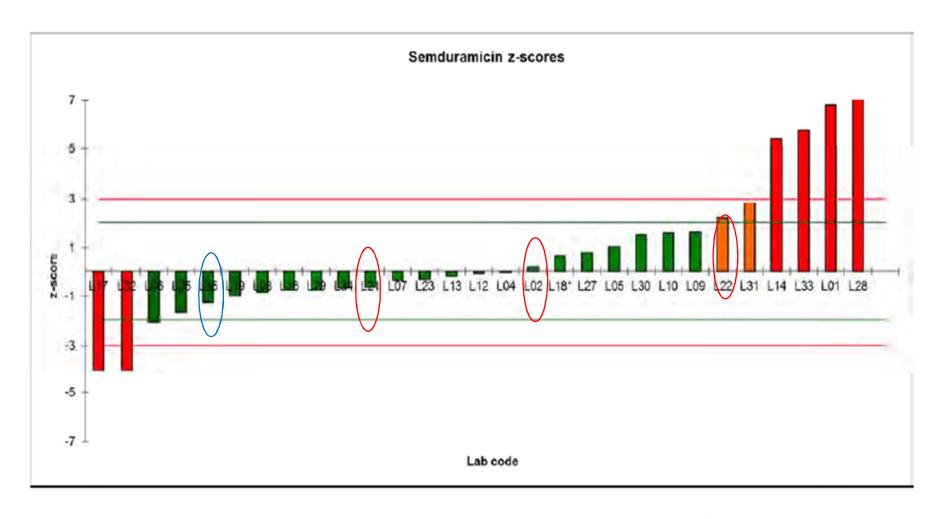


Figure 17: z-scores for the determination of semduramicin ( $x_a$ : 0.223 mg kg<sup>-1</sup>) for the participating laboratories. The green line shows the limit for satisfactory and the red line for questionable performance.



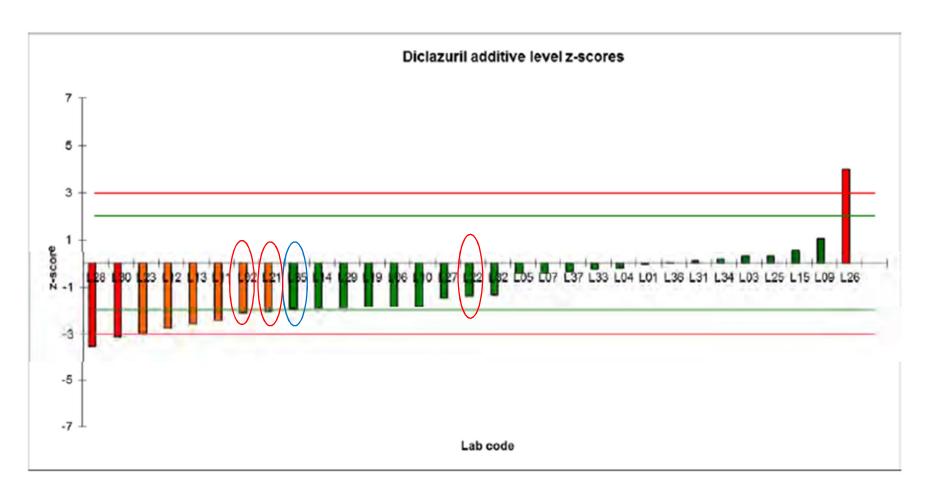
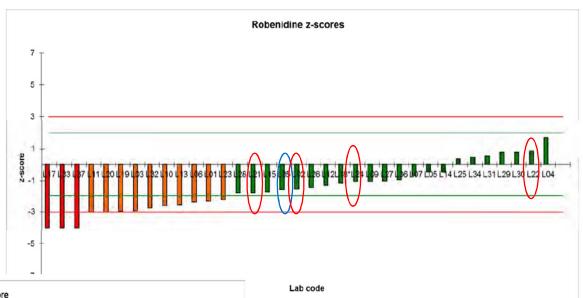


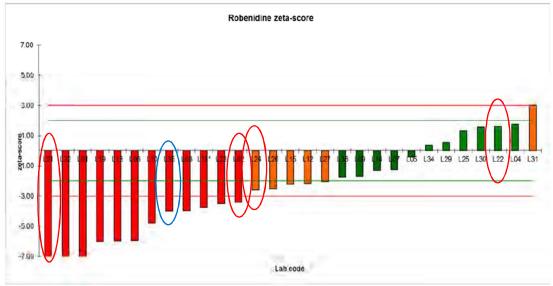
Figure 19: z-scores for the determination of diclazuril FA ( $x_a$ : 1.494 mg kg<sup>-1</sup>) for the participating laboratories. The green line shows the limit for satisfactory and the red line for questionable performance.



# $\zeta$ -scores





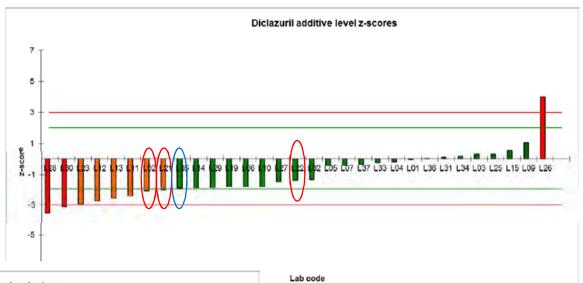












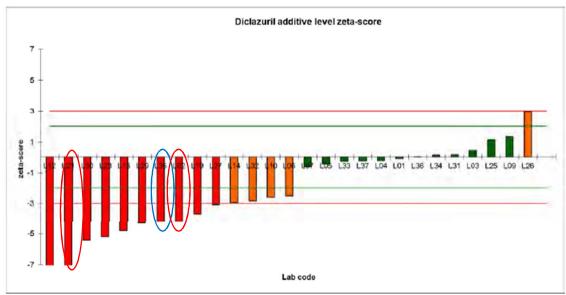
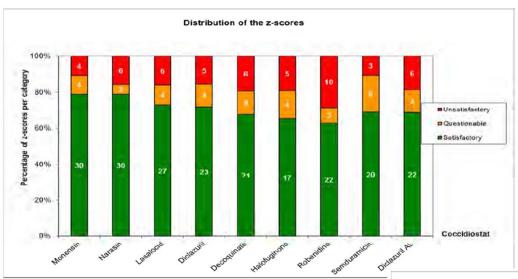
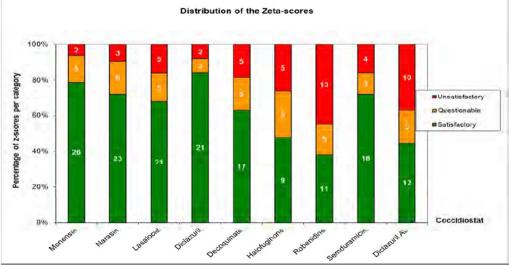




Figure 2: Complete distribution of the z- and  $\zeta$ -scores values. The number of reporting laboratories for each category is given in the graphs



Tratto da EURL-FA Report finale 2015





### Risultati Labs nazionali

|   | Lab code     |       |              |       |              |        |              |       |                    |       |
|---|--------------|-------|--------------|-------|--------------|--------|--------------|-------|--------------------|-------|
| Analita<br>(x <sub>ref</sub> ±σ <sub>p</sub> *) | 02<br>Scores |       | 21<br>Scores |       | 22<br>Scores |        | 24<br>Scores |       | 35 - ISS<br>Scores |       |
|   | Z            | ζ     | Z            | ζ     | Z            | ζ      | Z            | ζ     | Z                  | ζ     |
| Monensin<br>(1.083±0.170)                       | 0.28         | 0.37  | -1.43        | -4.06 | -0.19        | No Inc | -0.49        | -1.00 | -0.95              | -1.38 |
| Narasin<br>(0.692±0.116)                        | 2.56         | 2.65  | -1.54        | -5.22 | -4.00        |        | -0.97        | -2.01 | -1.85              | -3.17 |
| Lasalocid<br>(1.195±0.185)                      | -0.67        | -1.02 | -0.56        | -1.40 | 1.11         | No Inc | -0.03        | -0.04 | -1.13              | -2.40 |
| Diclazuril<br>(0.010±0.002)                     | -1.35        | -2.66 | -1.81        | -3.56 | -1.81        | No Inc | 0.93         | 1.29  | -0.44              | -0.61 |
| Decochinato<br>(0.394±0.072)                    | -020         | -0.35 | -0.59        | -1.74 | -0.75        | -2.04  | NA           | NA    | -0.49              | -1.00 |

<sup>\*</sup> $\sigma_p = u_{max}$ 

Scarto tipo della prova valutativa calcolato in base all'equazione di Horwitz o modificata da Thompson (diclazuril e alofuginone)

### Risultati Labs nazionali

| Analita<br>(x <sub>ref</sub> ±σ <sub>p</sub> *) | Lab code            |       |                     |            |                     |        |                     |       |                           |       |
|---|---------------------|-------|---------------------|------------|---------------------|--------|---------------------|-------|---------------------------|-------|
|   | 02<br>Scores<br>z ζ |       | 21<br>Scores<br>z ζ |            | 22<br>Scores<br>z ζ |        | 24<br>Scores<br>z ζ |       | 35 - ISS<br>Scores<br>z ζ |       |
| Alofuginone<br>(0.025±0.005)                    | -2.16               | -6.31 | -1.24               | -3.62      | -2.16               | No Inc | NA                  | NA    | 0.05                      | 0.06  |
| Robenidina<br>(0.609±0.104)                     | -1.52               | -3.39 | -1.80               | -<br>11.80 | 0.88                | 1.62   | -1.04               | -2.59 | -1.57                     | -3.99 |
| Semduramicin (0.223±0.044)                      | 0.15                | 0.21  | -0.66               | -1.54      | 2.18                | No Inc | NA                  | NA    | -1.24                     | -1.77 |
| Diclazuril (FA)<br>(1.494±0.223)                | -2.12               | -4.17 | -2.08               | -7.47      | -1.35               | No Inc | NA                  | NA    | -1.94                     | -4.17 |

<sup>\*</sup> $\sigma_p = u_{max}$ 

Scarto tipo della prova valutativa calcolato in base all'equazione di Horwitz o modificata da Thompson (diclazuril e alofuginone)

# Un valore di ζ-scores non soddisfacente può essere causato

✓ quantificazione non accurata della concentrazione dell'analita

✓ stima non idonea dell'incertezza associata

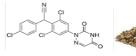


# Sovrastima o sottostima dell'incertezza di misura del lab

 $u_{min}$  (incertezza tipo del valore assegnato) <  $u_{lab}$  <  $u_{max}$  (scarto tipo della prova valutativa)



Sottostima dell'incertezza se  $u_{lab} < u_{min}$ Sovrastima dell'incertezza se  $u_{lab} > u_{max}$ 











Una valutazione dell'incertezza del lab si può fare considerando

$$\mathbf{x}_{\mathsf{lab}} - \mathbf{x}_{\mathsf{a}}$$

differenza tra i due valori piccola/incertezza larga: sovrastima dell'incertezza

deviazione tra i due valori ampia ma coperta dall'incertezza: incertezza assegnata idonea anche se larga



### -scores ISS-LNR

Lasalocid = -2,40

$$\begin{split} X_{lab} - X_{PT} &= -0,209 \ (18\%^*); \ u_{lab} \ 8\% \ u_{PT} \ 3 \ \%; \ U_{lab}\% \ 16_{(u_{lab} \, 8)}; \ \sigma_p\% \ 16^* \\ & \textbf{Narasin} \ = -3,17 \\ X_{lab} - X_{PT} &= -0,215 \ (31\%); \ u_{lab} \ 13\% \ u_{PT} \ 3 \ \%; \ U_{lab}\% \ 27_{(u_{lab} \, 13,5)}; \ \sigma_p\% 17 \\ & \textbf{Robenidina} \ = -3,99 \\ X_{lab} - X_{PT} &= -0,164 \ (27\%); \ u_{lab} \ 9\% \ u_{PT} \ 2 \ \%; \ U_{lab}\% \ 18_{(u_{lab} \, 9)}; \ \sigma_p\% 17 \\ & \textbf{Diclazuril} \ (\textbf{FA}) \ = -4,17 \\ X_{lab} - X_{PT} &= -0,434 \ (29\%); \ u_{lab} \ 9\% \ u_{PT} \ 2\%; \ U_{lab}\% \ 19_{(u_{lab} \, 9,5)}; \ \sigma_p\% 15 \end{split}$$

 $\sigma_p > u_{lab} > u_{PT}$  ma non ampia abbastanza da coprire lo scostamento dal valore assegnato? E' un problema di sottostima della

concentrazione?

\* Differenza % tra il  $x_{lah}$  e  $x_{PT}$ 

\* valore arrotondato

### CONCLUSIONI

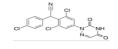
I lab. nazionali nel complesso hanno registrato un buon andamento in termini di z-scores

risultati da valutare

- √ Nar (sovrastima 0,990±0,110 vs 0,692±0,116) e Sem (sovrastima 0,320 vs 0,223±0,044) 1 lab
- ✓ Alo (sottostima 0,013±0,002 e 0,013 vs) 0,025±0,005) e Dicl FA (sottostima 1,020±0,110 e 1,030±0,055 vs 0,025±0,005) 2 lab

risultati non soddisfacenti

✓ Nar 1 lab < LOQ





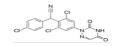






### CONCLUSIONI

✓ Nessun lab. ha riportato falsi negativi o falsi positivi











### Novità

### Workshop EURL-FA Control 17-18 Novembre

#### 2017

√ 4° PT per la determinazione di coccidiostatici nei mangimi

Matrice: mangime per polli

Analiti: clopidol, salinomicina, diclazuril, alofuginone,

decochinato (da confermare)

Livelli di concentrazione ?

### Novità

✓ Metodo per la determinazione di coccidiostatici a livello di additivazione e cross-contaminazione e di antibiotici vietati a livelli sub-terapeutici

Gennaio 2016 completamento validazione (collaborative trial)

Dicembre 2017 completamento della procedura finalizzata alla definizione di standard CEN

## Novità

### ✓ Dicalzuril

- 2014 EURL-FA Control: verifica in-house metodo Reg. 152/2009 (modifiche SPE 100 mg → 5000 mg);
- 2015 Ring trial (15 labs) e valutazione dei risultati
- No falsi positivi o falsi negativi;
- Deviazione standard relativa per la ripetibilità: 4,1% 14%
- Deviazione standard relativa per la riproducibilità: 13,2% -19,4%
- Horrat value < 1,5</p>

Conclusione: il metodo è fit for purpose

### Novità - metalli

√ 1° PT per la determinazione del cobalto nei mangimi (in collaborazione con EURL-HM)

# GRAZIE PER L'ATTENZIONE

